Untersuchungen zum Vorkommen und zur serologischen Differenzierung von Babesien bei Rindern im westlichen Allgäu

Bernd Ullmann

Diss. München
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546814_0012

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Untersuchungen zum Vorkommen und zur serologischen Differenzierung von Babesien bei Rindern im westlichen Allgäu

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Bernd Ullmann
aus
Michelstadt
München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 29. Juli 1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

All jenen gewidmet, welche daran interessiert sind!

Inhaltsübersicht

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Epidemiologie der Rinderbabesiose in Deutschland, Österreich und der Schweiz sowie Möglichkeiten des serologischen Nachweises mit IFAT und ELISA (anhand der Literatur)	2
III.	Eigene Untersuchungen	9
	A. Material und Methodik	9
	B. Ergebnisse	16
	1. Das Vorkommen von Zecken im Untersuchungsgebiet	16
	2. Infektionsgeschehen im Verlauf der Weideperiode	17
	a. Heimweiden	17
	b. Almweiden	18
	3. Isolierung von Babesien	19
	4. Serologische Abgrenzung der Babesienart	22
IV.	Besprechung der Ergebnisse	24
V.	Zusammenfassung	26
	Summary	27
VI.	Literaturverzeichnis	28
	Lebenslauf	

I. Einleitung

Die Rinderbabesiose hat in verschiedenen Gebieten Mitteleuropas eine gewisse wirtschaftliche Bedeutung. Zu ihrem Nachweis eignet sich im akuten Stadium der aus Peripherblut hergestellte und gefärbte Blutausstrich. Im latenten Stadium gelingt der direkte Erregernachweis meist nicht. Deshalb werden vermehrt serologische Nachweismethoden erarbeitet; sie sind für großflächige Durchseuchungsuntersuchungen besonders geeignet.

Ziel meiner Arbeit war es, das Vorkommen der Rinderbabesiose in einem westallgäuer Zuchtgebiet zu untersuchen.

II. Epidemiologie der Rinderbabesiose in Deutschland, Österreich und der Schweiz sowie Möglichkeiten des serologischen Nachweises mit IFAT und ELISA (anhand der Literatur)

Die Rinderbabesiose, im deutschsprachigen Raum als Blutharnen, Weiderot und Weideseuche bezeichnet, ist in Europa schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt (Kossel und Mitarb., 1904, zit. nach LEHNER, 1973). In Deutschland befaßten sich frühzeitig vor allem JACKSCHATH (1901), Kossel und Mitarb. (zit. nach LEHNER 1973) und NEVERMANN (1901) mit der Krankheit.

Bis 1911 wurden alle kleinen in Europa vorkommenden Babesien des Rindes als Babesia bovis bezeichnet. M'Fadjean und Stockmann 1911, zit. nach PURNELL (1981) beschrieben in Großbritannien eine Babesienart, Babesia divergens, die sich morphologisch von Babesia bovis unterschied; allerdings bewiesen erst DAVIES, JOYNER und KENDALL (1958), daß es sich bei B. divergens um eine eigenständige Spezies handelt. WIRAHADIREDJA (1964) hielt B. divergens für die in Deutschland am häufigsten vorkommende Rinderbabesienart.

Nach LEVINE (1971) werden vier in Europa vorkommende Rinderbabesienarten unterschieden.

Babesia bigemina, die größte Art, wird durch die zweiwirtige Rhipicephalus bursa und die dreiwirtige Zecke Haemaphysalis punctata übertragen; sie kommt vorwiegend in tropischen und subtropischen Gebieten vor und wird von verschiedenen Autoren auch als in Südeuropa beheimatet angesehen.

Der Erreger der seuchenhaften Hämoglobinurie des Rindes ist Babesia bovis, die zu den kleinen Babesienarten gezählt wird. Als Überträger kommen die einwirtige Zecke Boophilus annulatus, die zweiwirtige Rhipicephalus bursa und die dreiwirtige Ixodes ricinus in Frage. Verbreitungsgebiete sind Italien, Frankreich

(Brumpt, 1920, zit. nach LEHNER, 1973) sowie die Schweiz (MORISOD und Mitarb., 1972).

Eine weitere kleine Babesienart ist Babesia divergens, die vor allem durch ihre randständige Lage in den Erythrozyten sowie den stumpfen Teilungswinkel von B.bovis zu unterscheiden ist (DAVIES, JOYNER und KENDALL, 1958; WIRAHADIEREDJA, 1964; JUNGMANN, 1966); Ixodes ricinus gilt hier als Überträger. Diese Babesienart wird im gesamten nord- und mitteleuropäischen Raum sowie der Schweiz (Galli-Valerio, 1925, zit. nach AESCHLIMANN und HÖRNING, 1972), Österreich (Simitch, Petrovic, Racovec, 1955, zit. nach HINAIDY, 1981), Deutschen Demokratischen Republik (JUNGMANN, 1966) und in der Bundesrepublik Deutschland (ENIGK, FRIEDHOFF und WIRAHADIREDJA 1963; WIRAHADIREDJA, 1964; LEHNER, 1973) beschrieben.

Babesia major, die im Gegensatz zu den vorherigen Arten keine Hämoglobinurie hervorruft, gilt als wenig pathogen (KOMMERIJ, 1964). LEHNER (1973) vermutete allerdings, daß die von WITT (1908) sowie von KNUTH und MEISSNER (1911) beschriebenen Fälle von enzootischer Milzruptur bei Rindern in Norddeutschland auf B.major zurückzuführen sind. Als Verbreitungsgebiete werden England (BROCKLESBY und BARNETT, 1970), die Niederlande (BOOL, GOEDBLOED und KEIDEL, 1961; KOMMERIJ, 1964; ZWART und Mitarb., 1968), die Schweiz (AESCHLIMANN und HÖRNING, 1972) sowie Norddeutschland (ENIGK, FRIEDHOFF und WIRAHADIEREDJA, 1963; MELFSEN, 1978) angegeben. Als Überträger von B.major gilt Haemaphysalis punctata.

Nach den Erhebungen von Kossel und Mitarb. (1904, zit. nach GOERTTLER, 1929) zählt auch Bayern zu den verseuchten Gebieten, obwohl er bei seinen Untersuchungen B.major in Bayern nicht ermitteln konnte.

Da die Rinderbabesiose in der Bundesrepublik Deutschland

weder anzeige- noch meldepflichtig ist, fehlen detaillierte Angaben über ihr Vorkommen. Die Literatur befaßt sich fast ausschließlich mit der Verbreitung im norddeutschen Raum (ENIGK, FRIEDHOFF, WIRAHADIEREDJA, 1963; WIRAHADIEREDJA, 1964; MELFSEN, 1978) oder stammt aus der Zeit vor dem zweiten Weltkrieg (GOERTTLER, 1929). Erst DENNIG, LEHNER und TEUBNER (1974) führten Erhebungen im bayrischen Voralpengebiet durch, wo sie babesioseverdächtige Landkreise (Oberallgäu, Rosenheim, Traunstein, Bad Reichenhall) sowie eindeutig babesiosepositive Gebiete (Landkreis Bad Tölz) ermitteln konnten. Zu den von diesen Autoren als babesioseverdächtig eingestuften Landkreisen fügte RAUCH (1981) aufgrund serologischer Untersuchungen noch die Landkreise Berchtesgadener Land, Rottal-Inn sowie Ingolstadt hinzu; allerdings konnte er den direkten Parasitennachweis nicht führen.

Nach Erhebungen von HINAIDY (1981) treten jährlich zwischen 1500 und 2500 klinische Babesiosefälle in Österreich auf, die sich auf die Bundesländer Steiermark, Kärnten, Niederösterreich, Salzburg, Oberösterreich sowie Tirol in abnehmender Häufigkeit verteilen. In den endemischen Gebieten wurde nur B.divergens nachgewiesen.

Durch Untersuchungen von AESCHLIMANN, BROSSARD und QUENET (1975) konnten in der Schweiz in mehreren Gebieten verschiedene Rinderbabesienarten ermittelt werden. Es handelt sich hierbei um Bezirke nördlich des Genfer Sees, nördlich des Thuner Sees, im Schweizer Jura, in der Rhoneebene sowie im Tessin. Die nachgewiesenen Babesienarten sind B.bovis, B.major und B.divergens, wobei sich B.major auf den Tessin beschränkt. Nach Ansicht der Autoren läßt aber die Abgrenzung der Gebiete nicht darauf schließen, daß nicht doch noch weitere Babesienherde vorhanden sind.

Der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Zecken und klinischen Babesiosefällen gilt schon lange als erwiesen. Da Ixodes ricinus die am weitesten verbreitete Zeckenart ist und sie ein breites Spektrum von Säugetierspezies befällt (CERNY, 1975), wurden schon frühzeitig in Großbritannien (MAC LEOD 1932, 1939; EVANS, 1951) Untersuchungen über ihr Auftreten unternommen. Ähnliche Erhebungen führten für Niederösterreich LOEW und Mitarb. (1963, 1964) und für die Schweiz MERMOD, AESCHLIMANN und GRAF (1974) durch.

Saisondynamik sowie Dauer eines Entwicklungszyklus sind nach Ansicht verschiedener Autoren abhängig von Biotop und klimatischen Verhältnissen. Die Herstellung des Zusammenhanges zwischen dem Auftreten der Babesiose sowie der Aktivität von Ixodes ricinus gelang DONNELLY (1973), SIMON, RANCIEN und EUZEBY (1974). DONNELLY und PEIRCE (1975) sowie MOHAMMED (1976) überprüften die Übertragungsmöglichkeit von B.divergens durch die verschiedenen Entwicklungsstadien von I.ricinus. Es gelang ihnen, Zeckenweibchen am Rind zu infizieren, die dann durch transovarielle Übertragung infizierte Larven und Nymphen erzeugten; eine direkte Infektion von Larven und Nymphen am Rind gelang nicht.

Nähere Untersuchungen befassen sich mit der Wirtsspezifität von Babesien. ENIGK und FRIEDHOFF (1962) übertrugen B.divergens auf entmilzte Rehe, Rotwild, Damwild sowie auf Mufflon. Bei Schaf und Ziege verliefen die Übertragungsversuche negativ.

Menschliche Infektionen mit B.divergens sind ebenfalls beschrieben (FITZPATRICK und Mitarb., 1968). Schimpansen sowie Rhesusaffen sind auch empfänglich (GARNHAM und BRAY, 1959).

Bei Versuchen, ein geeignetes Labortier für B.divergens zu finden, infizierten CANNING, KILLICK-KENDRICK und MONK (1976) Hamster und weiße Ratten. IRVIN, YOUNG und OSBORN (1978) verwendeten Mäuse als Versuchstiere; eine dauerhafte Infektion gelang nicht, spätestens nach 4 Tagen waren die Parasiten aus dem Blut der Versuchstiere eliminiert und ließen sich auch nach Rückimpfung auf andere Tiere nicht mehr nachweisen. HOARE (1980) nimmt eine morphologische Ähnlichkeit zwischen B.divergens in Nagern und B.microti an.

Als hochempfindliches sowie spezifisches Labortier für B.divergens ermittelten LEWIS und WILLIAMS (1979) den Gerbil (Meriones unguiculatus). Die minimale Infektionsdosis beträgt nach LEWIS und Mitarb. (1981) 1×10^4 befallene Erythrozyten. Serologische Untersuchungen bei dieser Versuchstierart führten LIDDELL, JOSS und WILLIAMS (1982) erstmals durch.

Da der direkte Babesiennachweis meist nur in der akuten Krankheitsphase gelingt, wurden verschiedene serologische Tests zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen Babesien auf ihre Brauchbarkeit überprüft, modifiziert und neu entwickelt. Bei vergleichenden Untersuchungen erwiesen sich der indirekte Fluoreszenzantikörpertest (IFAT) sowie der Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) den anderen Methoden als überlegen (DONNELLY, JOYNER und CROSSMANN, 1972; WEILAND und KRATZER 1979). Hierbei gilt als spezifischer Test vor allem der IFAT (WEILAND, 1978).

Mit dem IFAT konnten ROSS und LÖHR (1968) B.bigemina-Antikörper noch zwei Jahre nach einer Infektion nachweisen.

DONNELLY, JOYNER und CROSSMANN (1972) verwendeten den IFAT zur Bestimmung der Infektionsrate in einer Milchviehherde nach

einem B.divergens-Ausbruch. Die Antikörper ließen sich kurz nach dem Auftreten der Parasitämie nachweisen und persistierten längere Zeit. Auch JOYNER, DONNELLY und PAYNE (1972) stellten Antikörper mit dem IFAT bei Rindern dar, die eine B.divergens- bzw. B.major-Infektion durchgemacht hatten. Mit diesem Test ließen sich nach LEEFLANG und PERIE (1972) B.bigemina, B.bovis, B.major und B.divergens unterscheiden. Auch GRAY und DE VOS (1981) verwendeten bei der Charakterisierung einer neu isolierten Babesienspezies diesen Test.

Nach Untersuchungen von TODOROVIC und LONG (1976), welche die Empfindlichkeit von IFAT und KBR bei Infektionen mit B.bigemina und B.argentina verglichen, spricht der IFAT 2 1/2 bzw. 4 Wochen früher an. Hierzu stehen allerdings die Ergebnisse von BIDWELL und Mitarb. (1978) im Widerspruch; sie verglichen KBR, ELISA und IFAT und stellten dabei fest, daß Antikörper mit der KBR früher nachgewiesen werden können, die dann aber sehr stark abfallen.

Menschliche Seren nach einer B.microti-Infektion wurden von CHISHOLM und Mitarb. (1978) gegen andere Babesienarten im IFAT getestet, wobei sich starke Kreuzreaktionen mit B.argentina, mäßige mit B.bigemina und geringe mit B.equi ergaben.

Unter Verwendung von somatischem Antigen von B.divergens sowie von B.rodhaini führte REIF (1980) mit dem ELISA den Nachweis spezifischer B.divergens-Antikörper. Bereits PURNELL und Mitarb. (1976) verwendeten den ELISA zum Nachweis einer Infektion mit B.divergens. Der maximale Antikörpertiter wurde von ihnen 14 Tage p.i. mit einem somatischen Extraktantigen von B.divergens festgestellt.

Antigen von B.rodhaini, einer Mäusebabesienart, setzten

WEILAND und DOHNA (1978) zum Nachweis von Babesienantikörpern in Hochimmunseren von Mäusen, Kaninchen und Hunden ein.

Bei Verwendung von somatischem Extraktantigen sowie metabolischem Antigen fand KRATZER (1979), daß das somatische Extraktantigen eine hohe Empfindlichkeit im ELISA aufwies. Weiterhin zeigte sie, daß Seren von experimentell mit B.bigemina infizierten Rindern sowie mit B.caballi infizierten Pferden mit dem B.rodhaini Antigen reagierten. Daraus folgerte sie, daß sich B.rodhaini-Antigen auch zum Nachweis einer B.divergens-Infektion eignen müsse.

Bei vergleichenden Untersuchungen mit IFAT und ELISA erhielten WEILAND und KRATZER (1979) in der latenten Phase der Infektion, in welcher der direkte Erregernachweis nicht mehr gelang, Antikörpertiter von 1:40 bzw. 1:80. HASSANE (1983) verwendete mit Blut benetztes und getrocknetes Filterpapier im ELISA zum Nachweis von B.divergens und B.caballi-Infektionen. Trotz der in Minimalkonzentration vorhandenen Antikörper erfolgte eine nach Ansicht des Autors eindeutige Reaktion.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methodik

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurden im Februar 1982 1616 Seren von Rindern verschiedenen Alters aus 65 Beständen der Gemeinden Maierhöfen, Grünenbach und Gestratz im Westallgäu (Kreis Lindau/B.) mit dem IFAT und ELISA auf Babesienantikörper unter Verwendung von B.divergens-Antigen untersucht. Aufgrund der Vorerhebungen wählte ich 34 Betriebe mit insgesamt 477 Rindern für die weiteren Untersuchungen aus, und zwar aus 16 Beständen, in denen ein hoher Anteil der Tiere Babesienantikörper (30-50 %) aufwies, sowie aus 18 weiteren, die zu den gleichen Weidegenossenschaften gehören. Die zu untersuchenden Tiere ordnete ich nach Alter und Haltung drei Gruppen zu. Gruppe A umfaßte alle Tiere über 2 Jahre, die schon mehrere Weideperioden durchlaufen hatten. Tiere, die 8 Monate bis 2 Jahre alt waren, eine Weideperiode hinter sich hatten und zur Älpung anstanden, wurden der Gruppe B zugeordnet. In die Gruppe C kamen die 2-8 Monate alten Jungtiere, die bisher noch keinen Weidegang hatten.

Allen Tieren entnahm ich vor Beginn der Weideperiode je 10 ml Blut aus der Vena jugularis. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1450 g wurden Serum und zellige Bestandteile getrennt, das Serum abpipettiert, portioniert und zur späteren Untersuchung bei -20^{o} C aufbewahrt. Von den Tieren der Gruppen B und C wurde nochmals im Oktober/November 1982, nach Beendigung der Älpung/Weideperiode, je 10 ml Blut gewonnen und untersucht. Während der Weideperiode fertigte ich im 14-tägigen Abstand von den Tieren der Gruppe C je einen Blutausstrich aus Peripherblut an, färbte ihn nach Giemsa und untersuchte ihn mikroskopisch (Vergrößerung 500-fach) jeweils 5 min. auf Babesien.

Nur die Seren von Rindern der Gruppe A, die in der Voruntersuchung mit Titern von 1:64 (ELISA) und 1:16 (IFAT) gegen B. divergens (Stamm Sylvenstein)-Antigen reagiert hatten, untersuchte ich zusätzlich im ELISA und IFAT mit B.bovis (Stamm Israel), B.divergens (Stamm Gestratz)-, B.major (Stamm Ameland)- und B.rodhaini (Stamm Tübingen)-Antigen sowie nur im IFAT mit B.microti (Stamm Sylvenstein)-Antigen, während von Rindern aus den Gruppen B und C alle Seren im ELISA und IFAT gegen die aufgezählten Antigene getestet wurden.

Zur Gewinnung von B.divergens-Antigen (Stämme Sylvenstein und Gestratz) verwendete ich Gerbils (Meriones unguiculatus), von B.rodhaini-Antigen NMRI-Mäuse aus institutseigener Zucht. Diese Tiere wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 18^{o} - 20^{o} C gehalten und erhielten Altromin-Mäusestandarddiät sowie Wasser ad libitum.

Auf dem Höhepunkt der Parasitämie (800‰ - 850 ‰) wurden die Gerbils, ebenso wie die mit B.rodhaini (Stamm Tübingen) infizierten NMRI-Mäuse entblutet. Unter Zusatz von 3.8 %iger Na-citratlösung gewann ich das Blut aus dem Herzen, zentrifugierte es 10 min. bei 1450 g, verwarf den Überstand sowie den Leukozytensaum. Das Sediment wusch ich 3 bis 4 mal mit PBS-pH 7,2, bis der Überstand klar war. Anschließend wurde für den IFAT ein kleiner Teil des Sediments mit den babesienhaltigen Erythrozyten im Verhältnis 1:4 resuspendiert und auf gefelderte Objektträger aufgetragen. Die so präparierten Objektträger wurden nach Lufttrocknung einzeln in Seidenpapier gewickelt, zu mehreren in Plastikbeutel unter Beifügung von Kieselgel verschweißt und bis zum Gebrauch bei -20^{o} C gelagert. Zur Herstellung des ELISA-Antigens wurde der größere Teil der babesienhaltigen Erythrozyten durch Zugabe von aqua dest. im Verhältnis 1:10 hämolysiert und so die Babesien freigesetzt. Die Isotonie des Hämolysats stellte ich durch Zugabe von gleichem Volumen PBS-pH 5,4 nach einer Minute ein. Das so behandelte

Hämolysat wurde nun 45 min bei 47000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in wenig PBS-pH 7,2 resuspendiert und bei -20° C aufbewahrt. Nach mehrmaligem Auftauen und Einfrieren wurde die Suspension mit 50 Watt Ausgangsleistung zur Zerstörung der Babesienhüllen ultrabeschallt, zur Hemmung des Keimwachstums mit 0,02 %igem Na-acid-PBS-pH 7,2 versetzt und anschließend das Antigen bei 4° C für 24 Std. mittels Magnetrührer extrahiert. Der Extrakt wurde nochmals bei 47000 g 45 min. zentrifugiert und der Überstand säulenchromatographisch unter Verwendung eines Gels mit dem effekt. Fraktionierungsbereich für globuläre Proteine von10000 bis 130000 aufgetrennt. Die Gelsäule war 50 cm hoch und hatte einen Durchmesser von 2,5 cm. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/h, als Elutionsflüssigkeit diente entlüfteter PBS-pH 7,2 mit 0,02 % Na-acid. Die Elutionskurven wurden automatisch durch einen Fallbügelschreiber aufgezeichnet. Nach der Auftrennung dialysierte ich die Fraktionen bei 4° C über 24 Std. gegen eine Mischung aus aqua dest. und PBS-pH 7,2 im Verhältnis 10:1. Die Fraktionen des Antigens wurden anschließend lyophilisiert, in Glasampullen eingeschweißt und bei -20° C aufbewahrt. Vor Gebrauch löste ich das lyophilisierte Antigen in aqua dest. und bestimmte den Proteingehalt nach der Methode von Folin-Ciocalteau, modifiziert von LOWRY und Mitarb. (1951).

Zur Gewinnung des B.bovis -sowie des B.major-Antigens standen mir ein intaktes und ein splenektomiertes Rind (beide DFV, weiterhin als "N" und "S" bezeichnet) zur Verfügung. "N" war ca. 3 Monate, "S" etwa 6 Monate alt; beide Tiere wurden in einem Anbindestall mit Strohheinstreu gehalten und mit Wasser und Heu ad libitum versorgt. "S" wurde mit B.major (Stamm Ameland), "N" mit B.bovis (Stamm Israel) s.c. infiziert. Infektionserfolg und -verlauf verfolgte ich durch tägliche Untersuchung eines Blutausstriches sowie die Kontrolle der

Körpertemperatur, Die Parasitämie bei "S" (B.major) betrug am Tage der Blutentnahme (8. Tag p.i.) etwa 160 ‰. Anschließend wurde das Tier mit 7 mg/kg KGW Berenil^{R} behandelt. Drei Tage p.med. konnten im Blutausstrich keine Parasiten mehr festgestellt werden. Die Verarbeitung des Blutes erfolgte wie vorstehend beschrieben; lediglich für den IFAT änderte sich das Verhältnis von Erythrozyten zu PBS-pH 7,2 auf 1:3. Dreizehn Tage p.i. waren beim nichtentmilzten Rind vereinzelte Babesien im Blutausstrich erkennbar. Ihm wurden nun 500 ml Blut aus der V. jugularis entnommen und "S" infundiert. Sieben Tage p.i. traten bei "S" wiederum die ersten Parasiten im Blutausstrich auf. Am 10. Tag p.i. entnahm ich "S" bei einer Parasitämie von 60 ‰ 1000 ml Blut und verarbeitete das gewonnene Blut wie oben beschrieben. Beide Tiere behandelte ich mit 7 mg/kg KGW Berenil^{R}.

Beim ELISA wird das Antigen an die Oberfläche der aus Polystyrol bestehenden Mikrotiterplatten gebunden. Vorhandene Serumantikörper verbinden sich mit dem Antigen zu einem Antigen-Antikörperkomplex. Mit Peroxidase konjugierte Antiglobuline reagieren spezifisch mit den gebundenen Antikörpern. Die Änderung der optischen Dichte, hervorgerufen durch die substratspaltende Peroxidase, ist abhängig von der Konzentration der Serumantikörper und wird photometrisch bestimmt.

In einem Vorversuch ermittelte ich die optimale Proteinkonzentration zur Beschichtung der Platten für den ELISA (B.divergens "S" 20 µg/ml; B.divergens "G" 10 µg/ml; B.major 20 µg/ml; B.bovis 20 µg/ml; B.rodhaini 10 µg/ml).

Bei der Durchführung des Tests hielt ich mich an die Angaben von VOLLER, BIDWELL und BARLETT (1979). Als Konjugatverdünnung, deren optimale Konzentration ebenfalls in einem Vorversuch er-

mittelt wurde, wählte ich jeweils 1:1000 (Konj.:4 % HSA-PBS-pH 7,2) und verwendete Peroxidase-konjugiertes IgG (Fa. Cappel). 5-Amino-Salizylsäure nahm ich als Substrat und maß nach einer Stunde bei 405 nm die Extinktion. Als positive Reaktion wertete ich Dichteveränderungen bei einer Serumverdünnung von 1:64 und höher.

Im IFAT werden die an das Antigen gebundenen Serumantikörper durch ihre Reaktion mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugierten Antiglobulinen nachgewiesen. Ich benutzte Fluorescein-konjugiertes IgG (Fa. Cappel) in einer Verdünnung von 1:20 mit IFAT-Puffer. Bei der Durchführung des Tests hielt ich mich an die Angaben von JOYNER, DONNELLY und PAYNE (1972). Die Auswertung erfolgte bei 252-facher Vergrößerung im Auflicht-fluoreszenzmikroskop. Als positiv bewertete ich die Probe, wenn Parasiten bei einer Serumverdünnung von 1:16 und höher deutlich fluoreszierten. Sowohl beim ELISA wie auch beim IFAT wurden stets bekannte positive und negative Seren zur Kontrolle mit untersucht.

Für die Babesien-Isolierungsversuche verwendete ich Gerbils aus institutseigener Zucht sowie je ein ca. 5 Monate altes DSB- und DFV-Rind. Hierfür entnahm ich 14 Rindern der Gruppe B, die nach dem Almaufenthalt serologisch positiv reagierten (ELISA: 1:64 und IFAT 1:16), jedoch im Frühjahr negativ gewesen waren, je 50 ml Blut aus der Vena jugularis, fügte 10 ml Na-Citrat bei und injizierte 2 Gerbils/Rind je 1 ml dieser Mischung i.p. Der Rest der Proben wurde gepoolt und auf ein nicht entmilztes DSB-Rind übertragen. Mittels täglicher Körpertemperaturmessung und Anfertigung eines Blutausstriches während 28 Tagen p.i. wurde das Rind, die Gerbils durch tägliche Blutausstriche überprüft. Außerdem gewann ich in

dreitätigem Abstand von diesem Rind Serum und untersuchte es mit ELISA und IFAT. Auf die gleiche Art wurde der Isolationsversuch mit Blut von 6 Tieren der Gruppe C bei Gerbils durchgeführt. Die Übertragung einer Sammelprobe auf ein Rind war nicht möglich. Für einen weiteren Isolierungsversuch wählte ich 25 Tiere der Gruppe A mit den höchsten Antikörpertitern aus. Den Gerbils wurden jeweils 2 ml i.p. injiziert. Die Sammelblutprobe wurde auf ein am 8. Tag p.i. entmilztes DFV-Rind übertragen. Die Überwachung des Versuches erfolgte wie vorstehend angegeben.

Zur Ermittlung des Erregerreservoirs bzw. des Infektionsortes kontrollierte ich mit einer Zeckenfahne täglich jeweils eine Stunde von Mai bis September 82 die Weiden, auf denen sich die erstmalig ausgetriebenen Tiere befanden, sowie die Almen der Weidegenossenschaften Maierhöfen und Grünenbach-Schönau im Bereich Steibis. Außerdem stellte ich Lebendfallen (Sherman traps) in diesen Gebieten zum Kleinsäugerfang auf. Die gefangenen Kleinsäuger untersuchte ich mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Ausstrichen auf Blutparasiten und sammelte die Ektoparasiten ab. Die Lage der Heimweiden betrug zwischen 700 und 800 m, die der beiden Almen zwischen 950 und 1100 m über NN. Die Nutzung der Heimweiden sowie deren Düngung (Gülle und Kunstdünger) wurde sehr intensiv betrieben; die an die Weiden grenzenden Waldränder dienten ebenfalls der Futtergewinnung.

Die Lage sowie Vegetation der beiden Almen (Unterlauchalm/Weidegen. Maierhöfen; Imberg/Weidegen. Grünenbach-Schönau) im Bereich Steibis waren miteinander vergleichbar;die Entfernung zwischen beiden beträgt ca. 2-3 km Luftlinie, sodaß ich mich mit meinen Almuntersuchungen auf die Unterlauchalm

beschränken konnte; außerdem wies sie einen höheren Viehbesatz auf und ich konnte die Tiere bei meinen täglichen Weide- und Fallen-Kontrollen besser auf Zecken absuchen.

B. Ergebnisse

1. Das Vorkommen von Zecken im Untersuchungsgebiet

Es war anzunehmen, daß im Bereich der Weidegenossenschaft Grünenbach-Schönau Zecken vorkommen, da in verschiedenen Rinderbetrieben Jungrinder und auch ältere Tiere bei der serologischen Untersuchung auf Babesien positiv reagiert hatten. Dabei handelte es sich um nicht aus anderen Gebieten zugekaufte, sondern in den einzelnen Beständen aufgezogene und nur auf den betriebseigenen Flächen geweidete Tiere.

Trotz intensiver Bemühungen konnte ich auf den verschiedenen, für Zecken günstigen Heimweiden mit Hilfe einer Zeckenfahne an Büschen und Sträuchern in den Monaten Mai/Juni lediglich 1 Larve, 11 Nymphen und 1 weibliche Adulte von Ixodes ricinus sammeln. Auch das tägliche Absuchen von geweideten Rindern nach Zecken im Verlauf der Weideperiode verlief negativ.

Da aus diesen Rinderzuchtbetrieben in den vergangenen Jahren zum Teil serologisch positive Tiere auf der Unterlauchalm (bei Oberstaufen/Steibis) gesömmert worden waren und im Untersuchungszeitraum Jungtiere auf diese Alm den Sommer über gebracht wurden, untersuchte ich auch dort mir als für Zecken typisch erscheinende Biotope auf das Vorkommen von Ixodes ricinus. Hier schlugen meine über die ganze Alpzeit ausgedehnten Bemühungen, sowohl mit der Zeckenfahne an Sträuchern als auch durch Absuchen der Tiere, völlig fehl.

Eine oftmals verläßlichere Methode der Feststellung von Zecken besteht im Fangen von Kleinnagern und deren Absuchen nach Zeckenlarven. So startete ich eine Fangaktion auf den Heimweiden von Mai bis Anfang Juli sowie auf der Unterlauchalm von Mitte Juni bis Anfang September (Almabtrieb).

In beiden Gebieten konnte ich auf diesem Wege Larven und Nymphen von Ixodes ricinus, wenn auch in sehr geringer Zahl, nachweisen (Tab. 1).

Untersuchungsgebiet	Anzahl an				gefundene Ixodes ricinus	
	Gelbhalsmäuse	Alpenspitzmäuse	Waldmäuse	Feldmäuse	Larven	Nymphen
Heimweiden Grünenbach-Schönau	2	4	19	4	6	1
Almweiden Unterlauchalm	47	17	19	12	-	11

Tab. 1: Vorkommen von Ixodes ricinus Larven und Nymphen an im Untersuchungsgebiet gefangenen Kleinnagern

Von diesen gefangenen Kleinnagern untersuchte ich, soweit möglich, gefärbte Blutausstriche. Bei keinem der gefangenen Tiere konnten Babesien nachgewiesen werden.

2. Infektionsgeschehen im Verlauf der Weideperiode

a. Heimweiden

Da bei den Voruntersuchungen Rinder, die bisher nur in unmittelbarer Nähe der Gehöfte gehalten wurden, serologisch positiv waren, mußte die Infektion mit Babesien in vorhergehenden Weideperioden auf den Heimweiden über Zecken stattgefunden haben. Zur Überprüfung wurden nun vor dem Weideauftrieb 58 Jungtiere (Gruppe C) im Alter von 2-8 Monaten, die vorher noch nie auf der Weide waren (Rinder der ersten Weideperiode), serologisch im IFAT und ELISA untersucht; als Antigen verwendete ich Babesia divergens, Stamm Sylvenstein. Ferner wurde diesen Tieren über die ganze Weideperiode alle 14 Tage Blut entnommen und im gefärbten Objektträger-

ausstrich auf Babesien untersucht; dabei gelang der direkte Parasitennachweis in keinem Falle. Die erneute serologische Untersuchung der 58 Jungrinder nach der Aufstallung im Herbst erbrachte bei 6 Tieren sowohl im IFAT als auch ELISA Titer unterschiedlicher Höhe (Tab. 2).

Weidegenossenschaft	n=Tiere	Serologisch positiv			direkter Parasitennachweis
		n	IFAT	ELISA	
Grünenbach-Schönau	24	1	1:16	1:64	-
		2	1:16	1:128	
Maierhöfen	34	2	1:16	1:128	-
		1	1:32	1:128	
insgesamt	58	6			-

Tab. 2: Nachweis von Babesien-Antikörpern bei Jungrindern am Ende der 1. Weideperiode (Gruppe C)

Auch wenn während des gesamten Untersuchungszeitraumes der direkte Parasitennachweis mit den Blutausstrichen nicht gelang, weisen die 6 serologisch positiv gewordenen Rinder darauf hin, daß auf den Heimweiden eine zumindest geringgradige Babesien-Infektion stattgefunden hat.

b. Almweiden

Von den meisten Betrieben der beiden Weidegenossenschaften Grünenbach-Schönau und Maierhöfen wurden die Jungtiere der zweiten Weideperiode auf den genossenschaftseigenen Almen Unterlauchalpe und Imberg/Steibis gesömmert. Es galt hier nun festzustellen, ob eine Babesieninfektion auf den Almen stattfindet. Ich untersuchte deshalb alle für die Älpung vorgesehenen Rinder bis zu 2 Jahren, die bereits auf den Heimweiden eine Weideperiode hinter sich hatten (Gruppe B), serologisch im IFAT und ELISA auf das Vorhandensein von Babesia-Antikörpern. Alle 208 Jungrinder, die bei der Erst-

untersuchung negativ waren, überprüfte ich erneut beim Almabtrieb; dabei erwiesen sich 29 Tiere in beiden Tests als positiv (Tab. 3); sie mußten sich also während der Sömmerung auf der Alm mit Babesien infiziert haben.

Weidegenossenschaft	n = Tiere	Serologisch positiv		
		n	IFAT	ELISA
Grünenbach-Schönau	58	6	1:16	1:128
		3	1:16	1:256
		2	1:32	1:256
		1	1:64	1:128
		1	1:64	1:256
Maierhöfen	150	6	1:16	1:64
		7	1:16	1:128
		1	1:16	1:256
		2	1:32	1:128

Tab. 3: Nachweis von Babesia-Antikörpern bei 2-jährigen Rindern nach der Älpung (Gruppe B)

3. Isolierung von Babesien

Um die im Untersuchungsgebiet infolge des Positivwerdens von einzelnen Rindern während der Weideperiode vermuteten Babesien auch morphologisch bestimmen zu können, wurde die Isolierung der Stämme durch Verimpfung von Blut auf Versuchstiere versucht. Hierzu dienten im wesentlichen Gerbils (Meriones unguiculatus), für gepoolte Blutproben auch 2 etwa 6 Monate alte Rinder (1x Schwarzbunt, 1x Deutsches Fleckvieh).

So gewann ich von 14 der während der Älpung serologisch positiv gewordenen Rinder (Gruppe B) je 50 ml Blut, versetzte

es mit 10 ml Na-citrat und injizierte davon jeweils 1 ml zwei Gerbils. Das restliche Blut der 14 Tiere wurde gepoolt und auf ein Rind übertragen. Von all diesen Versuchstieren wurden täglich gefärbte Blutausstriche auf Babesien hin untersucht. Jeden dritten Tag entnahm ich vom Rind zusätzlich 10 ml Blut, portionierte das durch Zentrifugation gewonnene Serum und bewahrte die Proben für die spätere serologische Untersuchung bei -20° C auf. Weder aus den 28 Gerbils noch aus den Rindern ließen sich Babesien rückisolieren. Entweder waren die serologisch positiven Rinder bei der Blutentnahme bereits parasitenfrei, oder aber die Babesien waren nur noch in so geringer Menge vorhanden, daß es in den Gerbils zu keiner Parasitämie kam.

Allerdings ergab die serologische Untersuchung des Versuchsrindes im ELISA bereits 6 Tage nach der Übertragung des gepoolten Blutes mit B.divergens-Antigen einen Titer von 1:128, mit B.rodhaini-Antigen eine Antikörperkonzentration von 1:16; nach 27 Tagen war mit beiden Antigenen ein Maximaltiter von 1:256 erreicht (Abb. 1). Im IFAT wurde erst 45 Tage nach der Blutinjektion mit beiden Antigenen ein Maximaltiter von 1:64 erreicht.

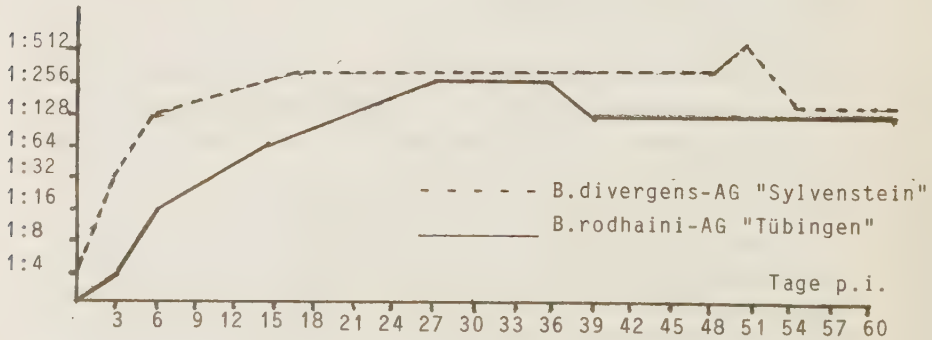

Abb. 1: Titerverlaufskurve (ELISA) bei einem 6 Monate alten Rind nach Übertragung von gepooltem Blut serologisch positiver Rinder (Gruppe B)

Auch durch die Übertragung von Blut der 6 auf den Heimweiden serologisch positiv gewordenen Jungrinder der ersten Weideperiode (Gruppe C) auf Gerbils ließen sich Babesien nicht bestätigen.

Schließlich versuchte ich bei den 25 über 2 Jahre alten Rindern der Gruppe A, welche bereits bei der Voruntersuchung im Frühjahr 1982 im IFAT und im ELISA bei Verwendung von B. divergens-Antigen (Stamm Sylvenstein) positiv reagiert hatten, die Isolierung des Erregers. Auch hier wurden je 50 ml Blut entnommen, jeweils mit 10 ml Na-citrat versetzt und davon 1 ml jeweils 2 Gerbils und das gepoolte Restblut einem entmilzten Rind injiziert. Lediglich bei 2 dieser 25 serologisch mit Titern von 1:16 und 1:32 im IFAT bzw. 1:256 und 1:128 im ELISA positiven Tiere ließ sich über Gerbils Babesia divergens isolieren. Beide Tiere stammten aus Betrieben der Gemeinde Gestratz. In den übrigen 23 Rindern ließ sich zumindest über Gerbils der direkte Parasitennachweis nicht führen.

Das splenektomierte Versuchsrind zeigte in beiden serologischen Tests nur unspezifische Reaktionen.

4. Serologische Abgrenzung der Babesien-Art

Bei den bisher geschilderten Ergebnissen fällt auf, daß die Seren einer gewissen Zahl von Rindern aus verschiedenen Betrieben des Untersuchungsgebietes sowohl im IFAT als auch im ELISA mit Babesia divergens-Antigen positiv reagierten. Andererseits war es mir nur bei zwei Tieren gelungen, Babesia divergens im Tierversuch (Übertragung von Blut auf Gerbils) zu isolieren. Es lag deshalb die Vermutung nahe, die Antikörperbildung könnte durch eine dort vorkommende andere Babesien-Art ausgelöst worden sein; es galt also, durch Verwendung von Antigen weiterer Babesia-Arten eine serologische Abgrenzung zu versuchen.

Die während meiner bisherigen Untersuchungen serologisch (auch mit niedrigen Titern) positiv reagierenden 477 Rinderseren testete ich vergleichend im IFAT und ELISA gegen Antigen von:

Babesia divergens (Stamm Sylvenstein)
Babesia divergens (Stamm Gestratz)
Babesia bovis (Stamm Israel)
Babesia major (Stamm Ameland)
Babesia rodhaini (Stamm Tübingen),
und Babesia microti (Stamm Sylvenstein) - nur im IFAT.

Es wurden die damit jeweils nachgewiesenen Antikörperreaktionen den früheren, ausschließlich gegen B.divergens-Antigen (Stamm Sylvenstein) gerichteten Titerhöhen gegenübergestellt.

Im IFAT glichen sich die mit den beiden Babesia divergens-Stämmen erzielten Titer; die teilweise beobachteten Unterschiede von 1-2 Titerstufen können methodisch oder auch dadurch bedingt sein, daß 211 Seren durch die fast 1-jährige Lagerung bei -20° C einen gewissen Aktivitätsverlust erlitten. Die beiden rinderspezifischen Arten B.bovis und B.major er-

brachten ebensowenig eine Reaktion wie die Nagerarten B.rodhaini und B.microti.

Im ELISA ergaben sich nicht nur zwischen den beiden B.divergens-Stämmen, sondern auch zwischen B.rodhaini und B.divergens (Stamm Gestratz) gewisse Übereinstimmungen, was die Titerhöhe betrifft (Tab. 4).

B.divergens (Sylvenstein) positiv		Titer von 1:... (Minimal-Maximal) bei Antigen			
n	Titer 1:...	B.divergens (Gestratz)	B.bovis	B.major	B.rodhaini
14	4	4-32	4-8	4-32	4-32
15	8	4-64	4-8	4-16	4-32
57	16	4-64	4-16	4-32	4-32
83	32	4-128	4-32	4-32	4-128
201	64	4-128	4-32	4-32	4-128
89	128	4-256	4-16	4-32	4-256
17	256	16-256	4-16	4-32	4-128
1	512	256	16	8	32

Tab. 4: ELISA-Antikörpertiter von 477 Rinderseren bei Verwendung von verschiedenen Babesia-Antigenen

Dabei ist bekannt, daß zwischen B.divergens und B.rodhaini Kreuzreaktionen auftreten. Bei Verwendung der beiden Rinderbabesien-Arten B.bovis und B.major als Antigen wurden nur Maximaltiter von 1:16 bis 1:32 erreicht.

Bei Zugrundelegung von 1:64 als Grenztiter im ELISA kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß im Untersuchungsgebiet nur Babesia divergens vorkommt.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Da in einem westallgäuer Rinderzuchtgebiet bei orientierenden serologischen Untersuchungen eine größere Zahl von Tieren auf Babesia divergens-Antigen im IFAT und ELISA positiv reagierten, sollte die Rinderbabesiose dort untersucht und Einzelheiten der Epidemiologie erarbeitet werden. Es war anzunehmen, daß Babesia divergens vorkommt und Ixodes ricinus als Überträger fungiert.

Meine Bemühungen, mit der Fahnenmethode auf den entsprechenden Weiden im späten Frühjahr Zecken zu finden, waren wenig erfolgreich. Es wurden auf den Heimweiden lediglich 13 Ixodes ricinus, vorwiegend Nymphen, gesammelt. Auch der Fang von 49 Gelbhalsmäusen, 21 Alpenspitzmäusen, 38 Waldmäusen sowie 16 Feldmäusen erbrachte auf diesen Kleinnagern nur 6 Zeckenlarven und 12 Nymphen. Diese geringen Zeckenfunde können mit dem langen Winter 1981/82 zusammenhängen; auch KRIPPEL und NOSEK (1978) sowie HENKEL (1982) wiesen auf eine mögliche Beeinflussung der Zeckenaktivitäten durch klimatische Umstände, vor allem in Gebirgslagen, hin.

Es ist interessant, daß trotz der geringen Zeckendichte sowohl auf den Heimweiden als auch auf den Almen bisher negative Rinder während der Weideperiode serologisch positiv wurden. Es muß also doch ein Antigenkontakt stattgefunden haben; allerdings gelang bei keinem dieser Tiere die Erreger-Isolierung. Lediglich aus zwei zu Beginn der Untersuchungen bereits serologisch positiven Rindern konnten durch Verimpfung von je 1 ml Blut auf 4 Gerbils Babesien isoliert werden; auf Grund der Größe von 1,5 x 0,4-0,8 µm, der birnenförmigen Gestalt und des stumpfen Teilungswinkels handelte es sich um Babesia divergens. Seit der Mitteilung von LEWIS (1979) gelten Gerbils als sensible Versuchstiere für diese Babesienart.

Die wenigen Parasitennachweise und die zahlreich positiven Reagenten ließen die Vermutung aufkommen, daß neben B.divergens noch andere rinderspezifische Babesia-Arten im Untersuchungsgebiet vorkommen, zumal B.major auch im norddeutschen Küstengebiet nachgewiesen ist (MELFSEN, 1978). Die vergleichende Untersuchung von 477 Rinderseren im IFAT und ELISA mit B.bovis- und B.major-Antigen erbrachte keinerlei Anhaltspunkte für diese Erregerarten.

Auch wenn klinische Babesiosen in den letzten Jahren im westlichen Allgäu bei Rindern nicht beobachtet wurden, haben die Untersuchungen, insbesondere die beiden B.divergens-Isolierungen, gezeigt, daß serologisch positive Tiere Babesienträger sind, daß eine gewisse Zeckenpopulation die Infektion auf bisher freie Tiere übertragen kann und daß im Untersuchungsgebiet ausschließlich B.divergens vorkommt.

V. Zusammenfassung

In einem westallgäuer Rinderzuchtgebiet wurden parasitologische und serologische Untersuchungen über das Vorkommen der Babesiose durchgeführt, der Infektionsverlauf während einer Weideperiode verfolgt und eine Abgrenzung der Erreger-Spezies versucht.

Von 1616 zu Beginn der Weideperiode serologisch untersuchten Rindern aus 65 Beständen waren 211 im IFAT (Titer 1:16 und höher) und ELISA (Titer 1:64 und höher) mit Babesia divergens-Antigen positiv. Während der Weidezeit infizierten sich auf den Heimweiden von 58 Kälbern 6, auf den Almweiden von 208 Jungrindern 29 neu.

Aus zwei bereits zu Beginn der Untersuchungen serologisch positiven Tieren wurde Babesia divergens mit Hilfe der Blutübertragung auf Gerbils isoliert. Vergleichende serologische Untersuchungen von 477 gegen B.divergens-Antigen positiven Rinderseren mit B.bovis- und B.major-Antigen bestätigten das ausschließliche Vorkommen von B.divergens.

Die in großem Umfang und von Anfang Mai bis Mitte September durchgeführte Überprüfung der Zeckenpopulation (Zeckenfahne, Fang von 124 Kleinnagern) ergab nur einige wenige Larven und Nymphen von Ixodes ricinus.

B. Ullmann: Investigations on the Occurrence of Babesia in Cattle in the Western Allgäu and their Serological Differentiation

Summary

Parasitological and serological investigations on the occurrence of babesiosis were carried out in a cattle breeding area in the Western Allgäu. The course of infection was followed up during one grazing season. Attempts were made to differentiate Babesia species serologically.

Out of 1616 cattle of 65 farms which were screened serologically at the beginning of the grazing season, 211 reacted positive to Babesia divergens antigen using IFAT (titre 1:16 and higher) and ELISA (titre 1:64 and higher).

New infections could be observed in 6 out of 58 calves fed on home pastures and 29 out of 208 heifers grazed on mountainous pastures during the grazing season.

By means of blood inoculation into gerbils, B.divergens could be isolated from two animals which had shown positive titres already before the grazing season. Comparative serological studies of 477 cattle sera, which exhibited positive reactions to B.divergens, were also tested against B.bovis and B.major antigen. The results confirmed B.divergens to be the only Babesia species occurring.

The abundance of ticks was investigated by means of trapping small mammals and flagging from May to September only very few larvae and nymphs of Ixodes ricinus were found.

VI. Literaturverzeichnis

Aeschlimann, A., B. Hörning (1972): Zur Geschichte der Piroplasmoseforschung in der Schweiz.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 114, 392-394

Aeschlimann, A., M. Brossard, G. Quenet (1975): Contribution à la connaissance des piroplasmes de Suisse.
Acta Trop. 32, 281-289

Bidwell, D.E., P. Turp, L.P. Joyner, R.C. Payne, R.E. Purnell (1978): Comparison of serological tests for Babesia in British cattle.
Vet. Rec. 103, 446-449

Bool, P.H., E. Goedbloed, H.J.W. Keidel (1961): De babesia soorten van het rund in Nederland: Babesia divergens en Babesia major.
Tijdschr. Diergeneesk. 86, 28-37

Brocklesby, D.W., S.F. Barnett, (1970): Large Babesia spezies transmitted to splenectomized calves by field collections of British ticks (Haemaphysalis punctata).
Nature 228, 1215

Canning, E.V., R. Killick-Kendrick, J.B. Monk (1976): Morphology of piroplasms in abnormal hosts and the identification of piroplasms in man.
J. trop. Med. Hyg. 79, 5-8

Cerny, V. (1975): The role of mammals in natural foci of tick borne encephalitis in Central Europe.
Folia Parasit. 22, 271-273

Chisholm, E., T.K. Ruebush, A.J. Sulzer, G.R. Healy (1978): Babesia microti infection in man: Evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 27, 14-19

Davies, S.F.M., L.P. Joyner, S.B. Kendall (1958): Studies on B.divergens (M'Fadjean & Stockman, 1911).
Ann. Trop. Med. Parasit. 52, 206-215

Dennig, H.K., M. Lehner, F. Teubner (1974): Ein Beitrag zum Vorkommen der Rinderbabesiose im südbayerischen Raum. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87, 190-193

Donnelly, J., L.P. Joyner, P.J. Crossmann (1972): The incidence of Babesia divergens infection in a herd of cattle as measured by the indirect immunofluorescent antibody test.
Res. vet. Sci. 13, 511-514

Donnelly, J. (1973): Epidemiology of Babesia infection in cattle.
Proc. Soc. Med. 66, 774-775

Donnelly, J., M.A. Peirce (1975): Experiments on the transmission of Babesia divergens to cattle by the tick Ixodes ricinus.
Int. J. Parasit. 5, 363-367

Enigk, K., K. Friedhoff (1962): Zur Wirtsspezifität von Babesia divergens
Z. Parasitenkd. 21, 238-256

Enigk, K., K. Friedhoff, S. Wirahadiredja (1963): Die Piroplasmosen der Wiederkäuer in Deutschland
Dtsch. tierärztl. Wschr. 70, 422-426

Evans, G.O. (1951): The seasonal incidence of Ixodes ricinus (L.) on cattle in Mid Wales.
Bull. ent. Res. 41, 459-468

Garnham, C.C., R.S. Bray (1959): The susceptibility of the higher primates to piroplasms.
J. Protozool. 6, 352-355

Gray, J.S., A.J. de Vos (1981): Studies on a bovine Babesia transmitted by Hyalomma marginatum rufipes Koch, 1844.
Onderstepoort J. Vet. Res. 48, 215-223

Goerttler, U. (1929): Verbreitung und Bekämpfung der Rinderpiroplasmose in Deutschland.
Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 59, 248-286

Hassane, M.H. (1983): Vergleichende Untersuchungen von Seren und Trockenblut (auf Filterpapier) experimentell mit Babesien infizierter Rinder und Ponies im ELISA und Stick-ELISA.
Vet. med. Diss., München

Henkel, G. (1982): Die Bedeutung von Kleinsäugern als Reservoir für Babesia divergens und Babesia microti in der Umgebung von Bad Tölz.
Vet. med. Diss., München

Hinaidy, H.K. (1981): Die Babesiose des Rindes in Österreich.
Wien. tierärztl. Mschr. 68, 52-57

Hoare, C.A. (1980): Comparative aspects of human babesiosis.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 143-148

Irvin, A.D., E.R. Young, G.D. Osborn (1978): Attempts to infect T-lymphocyte deficient mice with Babesia species of cattle.
Res. Vet. Sci. 13, 515-518

Jackschath, E. (1901): Die Malaria der Rinder in Deutschland.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 29, 585-589

Joyner, L.P., J. Donnelly, R. Payne (1972): The indirect fluorescent antibody test for the differentiation of infections with Babesia divergens or B.major
Res. vet. Sci. 13, 515-518

Jungmann, R. (1966): Die Piroplasmose des Rindes in der DDR - Ein Beitrag zur Epizootologie, Therapie und Prophylaxe.
Mh. Vet. Med. 21, 259-266

Knuth, P., W. Meissner (1911): Über die sogenannte Malaria; Milzruptur und Verblutung in die Bauchhöhle bei Rindern in der Provinz Schleswig-Holstein.
Berl. Tierärztl. Wschr. 27, 445-446

Kommerij, R. (1964): Piroplasmose bij het rund op Ameland.
Tijdschr. Diergeneesk. 89, 1791-1794

Kratzer, I. (1979): Die Brauchbarkeit der Babesia-rodhaini Antigene zum Nachweis von Babesien-Infektionen im ELISA. Vet. med. Diss., München

Krippel, E., J. Nosek (1978): Das Vorkommen der Zecke Ixodes ricinus L. in verschiedenen Waldgesellschaften der Westkarpaten.
Beiträge zur Geoökologie der Zentraleuropäischen Zeckenencephalitis 48-59. Springer Verlag, Heidelberg Berlin

Leeflang, P., N.M. Perie (1972): Comparative immunofluorescent studies on 4 Babesia species of cattle.
Res. vet. Sci. 13, 342-346

Lehner, M. (1973): Untersuchungen und Erhebungen zum Vorkommen der Rinderbabesiose im süddeutschen Raum.
Vet. med. Diss., München

Levine, N.O. (1971): Taxonomy of the piroplasms.
Trans. Amer. Micros. Soc. 90, 2-33

Lewis, D., H. Williams (1979): Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm B.divergens.
Nature 278, 170-171

Lewis, D., E.R. Young, D.G. Baggott, G.D. Osborn (1981): Babesia divergens infection of the Mongolian gerbil: Titration of infective dose and preliminary observation on the disease produced.
J. comp. Path. 91, 565-572

Liddell, K.G., A.W.C. Joss, H. Williams (1982): Serological response of the Mongolian gerbil to Babesia divergens (human strain) infection.
Ann. Trop. Med. Parasit. 76, 527-538

Loew, J., A. Radda, G. Pretzmann, E. Groll (1963): Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommermeningoenzephalitis in Niederösterreich.
1. Mitteilung Zbl. Bakt. 190, 183-206

Loew, J., A. Radda, G. Pretzmann, G. Studynha (1964): Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommermeningoenzephatitis (FSME) in Niederösterreich
4. Mitteilung
Zbl. Bakt. Parasitenkd. Infekt. Hyg. 194, 133-146

Lowry, D.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenolreagent.
J. Biol. Chem. 193, 265

Mac Leod, J. (1932): The bionomics of Ixodes ricinus L., the sheep tick of Scotland.
Parasitology 24, 382-400

Mac Leod, J. (1939): The seasonal and annual incidence of the sheep tick Ixodes ricinus L. in Britain.
Bull. ent. Res. 30, 103-118

Melfsen, J. (1978): Untersuchungen zum Vorkommen der Zecke Haemaphysalis punctate (Canestrini und Fanzago, 1977) in Nordfriesland sowie ihre vektorielle Bedeutung bei Rindern.
Vet. med. Diss., Hannover

Mermod, C., A. Aeschlimann, J. Graf (1974): Écologie et éthologie d'Ixodes ricinus L. en suisse. Deuciême note: Comparaison des population 1972 et 1973
Acarologia 16, 612

Mohammed, A.N. (1976): The seasonal incidence of ixodid ticks in the Netherlands.
Tijdschr. Diergeneesk. 101, 408-412

Morisod, A.,M. Brossard, C. Lambert, H. Suter, A. Aeschlimann (1972): Babesia bovis: transmission par Ixodes ricinus (Ixodidae) dans la plaine du Rhône.
Schweiz. Arch. Tierheilk, 114, 387-391

Nevermann, L. (1901): Der Parasit des "Blutharnens" der Rinder.
Berl. tierärztl. Wschr. 17, 645-648

Purnell, R.E., D.J. Hendry, D.E. Bidwell, P. Turp (1976): Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to B.divergens in cattle.
Vet. Res. 99, 102-105

Rauch, J. (1981): Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern und von zirkulierenden Antigenen an experimentell mit B. divergens infizierten und an Babesiose-verdächtigen Rindern mit dem Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA)
Vet. med. Diss., München

Reif, L. (1980): Der serologische Nachweis der Babesia divergens-Infektion des Rindes mit der Immunfluorenszenz, der indirekten Hämagglutination und dem Immuno-Enzymtest.
Vet. med. Diss., München

Ross, J.O.J., K.F. Löhr (1968): Serologic diagnosis of Babesia bigemina infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test.
Res. vet. Sci. 9, 557-562

Simon, P.H., P. Rancien, J. Euzeby (1974): A propos de l'endémie charollaise de piroplasmose bovine, 2^{e} Note: Etude epidemiologique et consequences prophylactiques.
Bull. Soc, Vet. Med. Comp 76, 411-421

Todorovic, R.A., R.F. Long (1976): Comparison of indirect fluorescent antibody (IFAT) with complement fixation (CF) tests for the diagnosis of Babesia spp. Infection in Columbian cattle.
Tropenmed. Parasit. 27, 169-181

Voller, A., D.E. Bidwell, A. Bartlett (1979): The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications.
Nuffield Lab. Comp. Med. Zoological Soc. of London, Reagent's Par, London W 1

Weiland, G. (1978): Der Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) als neue serodiagnostische Methode zum Nachweis parasitärer Infektionen.
Münch. med. Wschr. 120, 1457-1460

Weiland, D., H. Graf zu Dohna (1978): Die Brauchbarkeit des Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) zum Nachweis vom Babesien-Antikörpern in Hochimmunseren mit Hilfe von Ektoantigenen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 33-35

Weiland, G.,I. Kratzer (1979): Fluoreszenz- und enzymserologische Untersuchungen zum Nachweis der latenten Hundebabesiose
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 398-400

Wirahadiredja, S. (1964): Zur Morphologie von Babesia divergens M'Fadjean und Stockmann, 1911.
Vet. med. Diss., Hannover

Witt, A. (1908): Die Malaria des Rindes.
Idiopathische Milzruptur des Rindes - Malaria perniciosa des Menschen (eine Studie aus der Praxis).
Berl. Tierärztl. Wschr. 24, 625-626

Zwart, D., M.C. van den Ende, B. Kouwnhoven, J. Buys (1968): The difference between B. bigemina and a Dutch strain of B.major.
Tijdschr. Diergeneesk, 93, 126-140

Lebenslauf

Name:	Bernd Ullmann
Geburtstag und -ort	16. März 1953 in Michelstadt im Odenwald
Eltern:	Hans Ullmann, Beamter und Ehefrau Margit, geb. Metzger
1959-1963	Volksschule in Michelstadt
1963-1972	Gymnasium in Michelstadt Abschl. Allgem. Hochschulreife
1973-1975	Wehrdienst
1976	Studium der Chemie an der TH Darmstadt
1976-1981	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen mit Abschluß Staatsexamen
seit 1982	beschäftigt am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit der Anfertigung einer Dissertation

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch spreche ich meinen herzlichen Dank für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine wertvolle Unterstützung aus.

Herrn Dr. C. Centurier, Frl. S. Wegerdt und Frl. A. Schmerber danke ich sehr herzlich für die mir gewährte Unterstützung, sowie mein Dank natürlich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts gilt, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit behilflich waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Dr. K. Schlecht und Frl. P. Fröhling, ohne die die Ausführung meiner Arbeit nur sehr schwer möglich gewesen wäre.